

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2002-95493
(P2002-95493A)

(43)公開日 平成14年4月2日(2002.4.2)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 1 2 P 19/04		C 1 2 P 19/04	C 4 B 0 1 8
A 2 3 L 1/28		A 2 3 L 1/28	Z 4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	C 4 B 0 6 5
// (C 1 2 P 19/04		(C 1 2 P 19/04	
C 1 2 R 1:02)		C 1 2 R 1:02)	
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 12 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-286411(P2000-286411)

(22)出願日 平成12年9月21日(2000.9.21)

(71)出願人 800000013

有限会社 山口ティール・エル・オー
山口県宇部市東梶返1丁目10番8号 常盤
工業会館

(71)出願人 501121277

カセサート大学
タイ王国バンコック10900

(72)発明者 松下 一信

山口県山口市大字吉田1677番1号 山口大
学農学部

(74)代理人 100080539

弁理士 高木 義輝

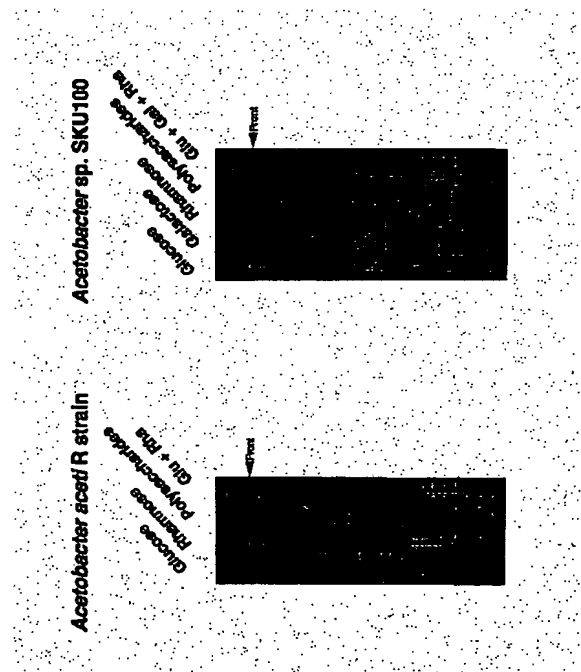
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 酢酸菌の菌膜を形成する多糖及びその精製方法

(57)【要約】

【課題】 微生物が生成する多糖類は、免疫賦活化能を有することが期待され、医薬もしくは食品添加物としての可能性が期待されている。本発明は、医薬もしくは食品添加物として工業的に利用される可能性が高い、アセトバクター属酢酸菌の菌膜を形成する新規な多糖及びその精製方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明の酢酸菌の菌膜を形成する新規な多糖は、酢酸菌アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成するグルコースとラムノースからなる新規な多糖であり、また、酢酸菌アセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成するグルコース、ラムノース及びガラクトースからなる新規な多糖である。本発明の精製方法は、細胞膜をリゾチーム処理で調整する工程、多糖を界面活性剤で細胞膜から外す工程などを含む新規な多糖の精製方法である。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 酢酸菌アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成するグルコースとラムノースからなる多糖。

【請求項2】 酢酸菌アセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成するグルコース、ラムノース、及びガラクトースからなる多糖。

【請求項3】 細胞をリゾチーム処理で調整する工程と、菌膜を形成する多糖を界面活性剤で細胞膜から外す工程とを含むことを特徴とする請求項1または請求項2記載の菌膜を形成する多糖を精製する方法。

【請求項4】 細胞膜から外した多糖をプロテアーゼ処理シタンパク質を分解除去する工程と、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で透析して脂質を除く工程とを含むことを特徴とする請求項1または請求項2記載の菌膜を形成する多糖を精製する方法。

【請求項5】 イオン交換クロマトグラフにより混入したタンパク質を除去する工程と、SDS 存在下でゲル濾過を行い混入した脂質を除去する工程とを含むことを特徴とする請求項1または請求項2記載の菌膜を形成する多糖を精製する方法。

【請求項6】 請求項3記載の工程、請求項4記載の工程、及び請求項5記載の工程とを含むことを特徴とする請求項1または請求項2記載の菌膜を形成する多糖を精製する方法。

【請求項7】 超音波処理により菌膜を形成する多糖を細胞膜から外す工程と、DNase・RNase処理によりDNA、RNAを分解除去する工程と、プロテアーゼ処理によりタンパク質を分解除去する工程と、水で透析する工程と、アルコール沈殿により多糖を回収する工程とを含むことを特徴とする請求項1または請求項2記載の菌膜を形成する多糖を精製する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酢酸菌が生成する菌体外多糖に係わり、特に、アセトバクター (Acetobacter) 属酢酸菌の菌膜を形成する多糖及びその精製方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】微生物が生成する多糖類は、免疫賦活能を有することが期待され、様々な微生物から分離され医薬もしくは食品添加物としての可能性が検討されている。特に、酢酸菌は食酢の生産に用いられ利用されてきた細菌であり、その食品としての安全性は数千年の経験的保証がなされている。

【0003】これまで、種々の酢酸菌から、様々な種類の菌体外多糖の生産が報告されているが、酢酸菌の培地表面への浮遊に関与する多糖に関しては、アセトバクター属酢酸菌の一種であるアセトバクター・キシリナム (Acetobacter xylinum) で報告されているだけである。このアセトバクター・キシリナムは、菌体表面に付

着した多糖としてセルロース (Cellulose) を生成することが知られおり、特開2000-004895号 (バクテリアセルロースの製造方法)、特開平10-276736号 (酢酸菌セルロースを含む発酵飲料の製造方法)、特開平09-107939号 (冷凍食品の製造方法) などに示されているように広く工業的に利用されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】そこで、本発明の目的は、アセトバクター属酢酸菌の菌膜を形成する新規な多糖及びその精製方法を提供することにある。この新規な多糖は、免疫賦活能を有することが期待され、医薬もしくは食品添加物として工業的に利用される可能性が高いものと期待される。

【0005】酢酸菌、特にアセトバクター属酢酸菌は、絶対好気性細菌でありながら、静地培養で生育できる。絶対好気性細菌である酢酸菌が静地培養で生育できるのは、菌体表面にある種の多糖を生成することで、培地表面に浮遊する能力をもつためであり、アセトバクター・キシリナムは、セルロースから成る菌膜を形成し、培地表面に浮遊して生育することが知られている。

【0006】発明者らは、酢酸菌アセトバクター・アセチ (Acetobacter aceti) から、光沢があり滑らかなコロニー表面をもつ菌種 (S株) と、光沢がなく粗面のコロニー表面をもつ菌種 (R株) の2つのコロニー形態の異なる菌株を分離した。S株は、振盪培養下でよく生育するが、培地表面に浮遊する能力を欠いているため、静地培養を行っても液面に菌膜を形成することはない。一方、R株は、振盪・静地培養どちらでも生育でき、静地培養下では、培地表面に浮遊し菌膜を形成して生育することができる。

【0007】本発明者らは、アセトバクター・アセチR株とS株との相違をセルロース生成能の有無によるものと想定し、セルロース生成能の有無の原因を分子レベルで調べる研究を開始したが、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖が、セルロースとは異なる多糖であることを見出した。本発明者らは、更に鋭意研究を重ね、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖を特定し、その多糖の分離精製方法を確立した。合わせて、タイで分離された耐熱性酢酸菌アセトバクター・sp.SKU100 (Acetobacter sp.SKU100) の菌膜を形成する新規な多糖を特定し、その多糖の分離精製方法を確立して本発明を完成させた。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明のアセトバクター属酢酸菌の菌膜を形成する多糖は、酢酸菌アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成するグルコースとラムノースからなる新規な多糖であり、また、酢酸菌アセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成するグルコース、ラムノース、及びガラクトースからなる新規な多糖である。

【0009】本発明のアセトバクター属酢酸菌の菌膜を

形成する多糖の精製方法は、細胞膜をリゾチーム処理で調整する工程と、菌膜を形成する多糖を界面活性剤で細胞膜から外す工程とを含むアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖、または、アセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成する新規な多糖を精製する方法である。また、細胞膜から外した多糖をプロテアーゼ処理しタンパク質を分解除去する工程と、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) で透析して脂質を除く工程とを含む上記の菌膜を形成する新規な多糖を精製する方法である。さらにまた、イオン交換クロマトグラフにより混入したタンパク質を除去する工程と、SDS 存在下でゲル濾過を行い混入した脂質を除去する工程とを含む上記の菌膜を形成する新規な多糖を精製する方法である。

【0010】上記の精製方法は、菌膜を形成する多糖を穏やかに分離し、高純度に精製するに好適な精製方法である。なお、各工程は、目的とする製品により、適宜、組み合わせたり省略することができる。

【0011】本発明のアセトバクター属酢酸菌の菌膜を形成する多糖の精製方法は、簡便な精製方法として、超音波処理により菌膜を形成する多糖を細胞膜から外す工程と、DNase・RNase処理によりDNA、RNAを分解除去する工程と、プロテアーゼ処理によりタンパク質を分解除去する工程と、水で透析する工程と、アルコール沈殿により多糖を回収する工程とを含むアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖、または、アセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成する新規な多糖を精製する方法である。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明のアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖と、アセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成する新規な多糖を特定し、その多糖の精製方法を確立した形態を、順次、図によって詳細に説明する。

【0013】図1は、アセトバクター・アセチの多糖の特性を分析した結果を示した図である。菌膜形成能のあるアセトバクター・アセチR株と菌膜形成能のないS株との菌体糖含量を比較 (図1、糖含量) すると、R株は、S株の4～5倍の糖含量値を示し、菌膜成分が多糖であることを示唆している。また、R株の菌膜多糖は、アルカリ感受性 (図1、アルカリ処理)、セルラーゼ耐性 (図1、セルラーゼ処理) を示す。

【0014】さらに、詳細なデータは省略するが、 β -1,3、 β -1,6、もしくは α -1,4グリコシダーゼによって分解されず、また、PCR法により関連遺伝子の検索を行ったが、セルロース合成酵素やその類似遺伝子も存在しない。

【0015】以上のような多糖の特性分析により、アセトバクター・アセチR株の菌膜はセルロース以外の何らかの多糖で形成されていることを解明した。

【0016】図2は、アセトバクター・アセチの走査電

子顕微鏡像を示した写真である。図2によれば、R株は、S株と異なり、菌体表面が粘液質の物質 (菌膜) で覆われており、これが多糖成分によるものと考えられる。

【0017】図3は、アセトバクター・アセチR株とアセトバクター・キシリヌムとの細胞表面における多糖の形態を走査電子顕微鏡像で示した写真であり、アセトバクター・アセチR株の菌膜が、アセトバクター・キシリヌムが付着しているセルロースとは、その形態が著しく異なることを示している。即ち、アセトバクター・アセチR株の菌膜はセルロース以外の多糖で形成されていることを示している。

【0018】図4は、分離精製法の検討にも係わり、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖の局在部位を検討した結果を示す図である。イソプロパノールで沈降する多糖成分は、その殆どが細胞菌体に回収され、培地中には殆ど排出されない (図4、A)。また、1.5分までの短い超音波処理では殆ど菌体から分離せず、長い処理時間 (10分) で初めて分離する (図4、B)。これらは、菌膜がかなり強く菌体に結合していることを示している。さらにまた、多糖は超音波処理ではかなり断片化するため、細胞をリゾチームで穏やかに壊して細胞膜を調整すると、殆どの糖は細胞膜画分に回収される (図4、C)。

【0019】図5は、TLCにより、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖と、アセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成する多糖の構成成分を分析した結果を示す図であり、精製した多糖をトリフルオロ酢酸で酸加水分解し、多糖の構成成分をTLCによって分析したものである。アセトバクター・アセチR株の多糖 (図5の左) ではグルコース (Glucose)、ラムノース (Rhamnose) の2種が検出され、アセトバクター・sp. SKU100の多糖からはグルコース、ラムノース、及びガラクトース (Galactose) が検出された。

【0020】図6は、ガスクロマトグラフィーによりアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖を分析した結果を示す図である。精製しトリフルオロ酢酸で酸加水分解した多糖を、アセチル化し、得られたアルジール誘導体をガスクロマトグラフィーにより分析し、構成糖の種類と共に、そのモル比の解析を行ったものである。その結果、グルコースとラムノースに対応するピークが得られ、その構成は、グルコース：ラムノース＝1：1であることを特定した。

【0021】図7は、同様にして、ガスクロマトグラフィーによりアセトバクター・sp. SKU100の菌膜を形成する多糖を分析した結果を示す図である。その結果、グルコース、ラムノース、ガラクトースに対応するピークが得られ、その構成は、グルコース：ラムノース：ガラクトース＝1：1：1であることを特定した。

【0022】以上のような実施の形態により、酢酸菌ア

セトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖がグルコースとラムノースからなる新規な多糖であり、また、酢酸菌アセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成する多糖がグルコース、ラムノース、及びガラクトースからなる新規な多糖であることを特定した。

【0023】次に、本発明の酢酸菌の菌膜を形成する多糖の精製方法について説明する。

【0024】なお、詳細な精製方法は、後述の、実施例で説明する。

【0025】本発明の精製方法は、本発明の菌膜多糖成分が有する特性である、細胞膜からの界面活性剤による可溶性、プロテアーゼ耐性、DNase・RNase耐性、透析不能性、アルコール沈降性、高分子化合物、などを利用して確立したものである。

【0026】最初に、均一な分子量の多糖が得られ、高純度に精製するに好ましい精製方法を、第一の好ましい実施の態様として説明する。

【0027】第一の好ましい精製方法の実施の態様は、まず、細胞をリゾチームで穏やかに壊して細胞膜を調整し、殆どの多糖が回収される細胞膜画分より、多糖を界面活性剤で可溶化し細胞膜から穏やかに外すことにより、均一な分子量の多糖を分離する。さらに、細胞膜から外した多糖を、プロテアーゼ処理によるタンパク質の分解除去、SDS透析による脂質の溶解除去、さらにまた、イオン交換クロマトグラフによる混入タンパク質の除去、SDS存在下でのゲル濾過による混入脂質の除去を含む精製方法であり、これにより、高純度に精製した多糖が得られる。

【0028】なお、上記、第一の好ましい精製方法の実施の態様は、目的とする製品により適宜、工程の組み合わせや省略などができる。例えば、高純度のものが必要な場合、SDS存在下でのゲル濾過により混入脂質を除去する工程を省略できる。

【0029】次に、均一な分子量が必要なく、高純度に精製する必要がない製品に好ましい簡便な精製方法を、第二の好ましい実施の態様として説明する。

【0030】第二の好ましい精製方法の実施の態様は、超音波処理により目的の多糖を細胞膜から外し、引続き、プロテアーゼ処理によるタンパク質の分解除去、DNase・RNase処理によるDNA、RNAの分解除去、さらにまた、水での透析、アルコール沈殿による多糖回収を含む精製方法である。本精製方法では、超音波処理により多糖を細胞膜から分離する方法が、第一の実施の態様と比較し多糖に作用する力が大きいため、多糖が破壊され易く均一な分子量を得るのが難しい。また、多少の脂質とかタンパク質が含まれるのが避け難いが、工程が少なく簡便な方法であり、これらが許容される製品に対しては好適な精製方法である。

【0031】本発明の酢酸菌の菌膜を形成する多糖及びその精製方法は、免疫賦活化能を有することが期待さ

れ、医薬もしくは食品添加物として工業的に利用される可能性が高い新規な多糖を提供する。具体的には、本発明が提供する新規な多糖は、消化されない特性を活かした、ダイエット用食品添加物もしくは増量剤としての利用、微生物分解され難い特性を活かした、柔らかな保護用バイオフィームとしての利用などが考えられる。

【0032】

【実施例】本発明の、酢酸菌の菌膜を形成する多糖の精製方法の実施例を、以下、詳細に説明する。

【0033】第一の実施例として、図8により、上記、第一の好ましい精製方法の実施の態様を、本発明のアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖の精製に適用した例で説明する。

【0034】培養後に菌体を集菌し、20%ショ糖を含むトリス緩衝液に懸濁の後、リゾチームとEDTAをそれぞれ最終濃度が0.25 mg/mlと1 mMになるように添加する。この懸濁液を30℃で一時間穏やかに振盪し、その後遠心分離によって沈殿(Ppt: Precipitate)を集める。このようにして得られるスフェロプラストを、MgとDNaseを含む少量のリン酸緩衝液に懸濁し、その懸濁液を100倍量のリン酸緩衝液に希釈する。この希釈液を30℃で30分間穏やかに振盪した後、遠心分離により沈殿を除いて、その上澄み(Sup: Supernatant)を集める。得られたこの上澄みをさらに超遠心分離して、沈殿を集める。

【0035】このようにして得られた細胞膜を次にリン酸緩衝液に懸濁し、1%になるように界面活性剤であるb-オクチルグルコシドを添加する。25℃で一時間攪拌した後、超遠心分離によって、上澄みを集める。この上澄みに、プロテアーゼ(Proteinase K)を最終濃度が0.2 mg/mlになるように添加し、24時間37℃にて放置する。その後、この溶液を0.1%SDSを含むNaCl溶液に対して24時間透析する。その後、この透析液を遠心分離で沈殿を除き、上澄みに2倍量のイソプロピルアルコールを添加して、4℃で一晩放置した後、遠心分離で沈殿を回収する。

【0036】この沈殿(粗多糖画分I)を少量のトリス緩衝液に懸濁し、超遠心分離で沈殿を除いた後、DEAE-セルロースカラムにチャージし、同じ緩衝液で溶出し、非吸着画分を回収する。この画分を、上述のように、イソプロピルアルコールで沈殿させ、得られた沈殿(粗多糖画分II)を少量の0.1%SDSを含むNaCl溶液に懸濁した後、ゲル濾過(Sephacryl S-500)カラムにチャージする。カラムは同じ溶液で溶出し、目的の多糖を含むピーク画分を再びイソプロピルアルコールで沈殿させる。この沈殿を再び少量のSDS/NaCl溶液に溶かして、2回目のゲル濾過を行う。このゲル濾過のピーク画分を合わせて、イソプロピルアルコールで沈殿として、最終精製多糖とする。

【0037】以上、詳細に説明した第一の好ましい精製

方法の実施例によれば、均一な分子量を有し、高純度に精製された、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成するグルコースとラムノースからなる新規な多糖を得ることができる。

【0038】次に、第二の実施例として、図9により、第二の好ましい精製方法の実施の態様を、本発明のアセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成する新規な多糖の精製に適用した例で説明する。

【0039】培養後に菌体を集菌し、リン酸緩衝液で洗浄の後、同じ緩衝液に懸濁する。得られた菌体懸濁液を最大出力で超音波処理を10分間ほど施す。その後、遠心分離により、上澄みを回収し、さらに超遠心分離にかけ、この超遠心分離の上澄みに、DNase と RNase をそれぞれ 50mg/ml になるように加えて、37℃で24時間処理をする。引き続き、プロテアーゼ (Proteinase K) を最終濃度が 0.2 mg/ml になるように添加し、24時間37℃にて放置する。その後、この溶液を蒸留水に対して24時間透析する。その後、この透析液を遠心分離で沈殿を除き、上澄みに2倍量のイソプロピルアルコールを添加して、-20℃で24時間放置した後(4℃で一晩放置でもよい)、遠心分離で沈殿を回収する。この沈殿(粗多糖画分)を少量の蒸留水に懸濁し、超遠心分離で沈殿を除いた後、ゲル濾過 (Superdex S-200) カラムにチャージする。カラムはNaCl 溶液で溶出し、目的の多糖を含むピーク画分を合わせて、凍結乾燥して最終精製多糖とする。

【0040】以上、詳細に説明した第二の好ましい精製方法の実施例によれば、アセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成するグルコース、ラムノース、及びガラクトースからなる新規な多糖を簡便に得ることができる。

【0041】

【発明の効果】本発明の酢酸菌の菌膜を形成する多糖及びその精製方法は、免疫賦活能を有することが期待され、医薬もしくは食品添加物として工業的に利用される

可能性が高い新規な多糖を提供する。本発明が提供する新規な多糖は、具体的には、消化されない特性を活かした、ダイエット用食品添加物もしくは増量剤、微生物分解され難い特性を活かした、柔らかな保護用バイオフィルム、などに利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】アセトバクター・アセチの多糖の特性を分析した結果を示した図である。

【図2】アセトバクター・アセチの走査電子顕微鏡像を示した写真である。

【図3】アセトバクター・アセチR株とアセトバクター・キシリウムとの細胞表層における多糖の形態を走査電子顕微鏡像で示した写真である。

【図4】アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖の局在部位を検討した結果を示す図である。

【図5】TLCにより、アセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖と、アセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成する多糖の構成成分を分析した結果を示す図である。

【図6】ガスクロマトグラフィーによりアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する多糖を分析した結果を示す図である。

【図7】ガスクロマトグラフィーによりアセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成する多糖を分析した結果を示す図である。

【図8】第一の好ましい精製方法の実施の態様を、本発明のアセトバクター・アセチR株の菌膜を形成する新規な多糖の精製に適用した実施例を示す図である。

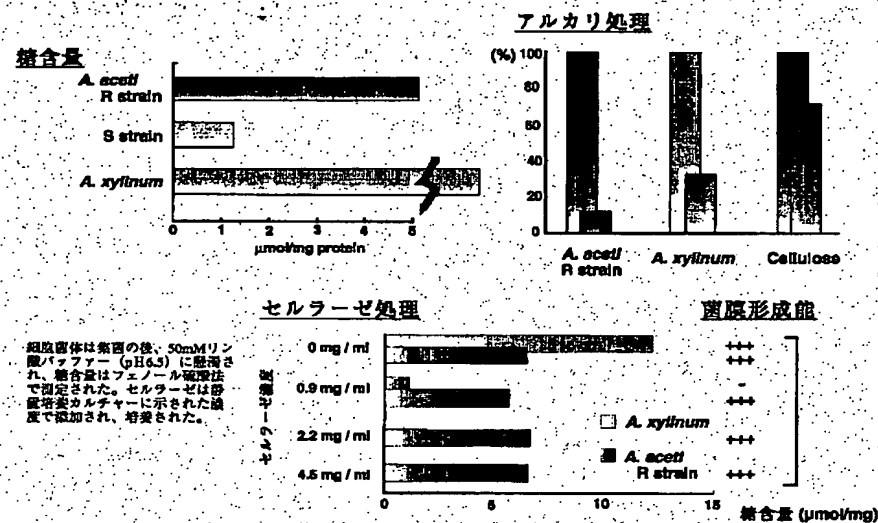
【図9】第二の好ましい精製方法の実施の態様を、本発明のアセトバクター・sp.SKU100の菌膜を形成する新規な多糖の精製に適用した実施例を示す図である。

【符号の説明】

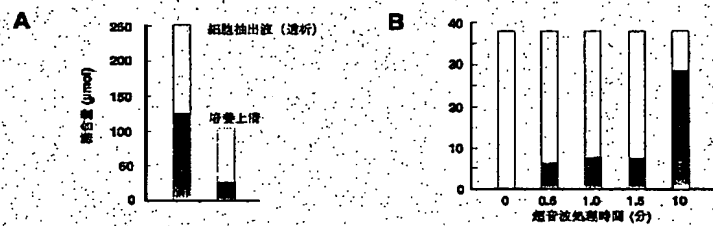
Sup : 上澄み (Supernatant)

Ppt : 沈殿 (Precipitate)

【図1】



【図4】



(A) *A. acetii* R 株を培養後、細胞と培養上清に分離した。その細胞は破碎後、透析して細胞抽出液とした。その抽出液と培養上清からアルコール沈殿によって回収された多糖成分 (影の部分) とその上清 (白い部分) の多糖量を測定した。

(B) 菌体を様々な時間超音波処理し、その後、細胞残渣 (影の部分) と上清 (白い部分) に別けて、その多糖量を測定した。

C

細胞をリゾチーム処理によってスフェロプラストに変換した後、穏やかに破碎すると、ほとんどの多糖は細胞膜成分に回収される。

百分	総タンパク量 (mg)	多糖含量 (μmol)	糖/タンパク比 (μmol/mg)	回収率 (%)
菌体	978	2444	2.5	100
細胞質	282	470	1.7	19.2
細胞質膜	362	2400	6.6	98.2
細胞残渣	30	180	6.0	7.4

【図2】

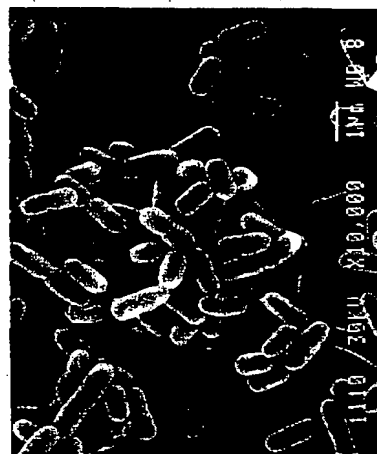
R株 (振盪培養)



R株 (静置培養)



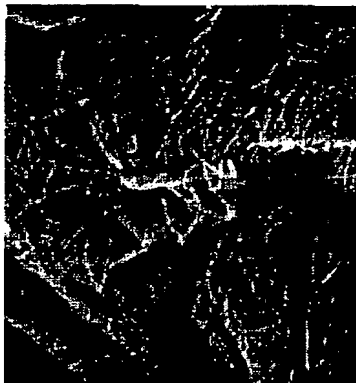
S株



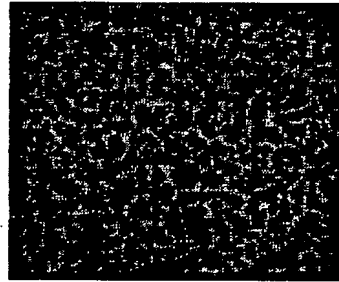
Acetobacter aceti の走査電子顕微鏡像

【図3】

静置培養で生育した
A. acet R strain

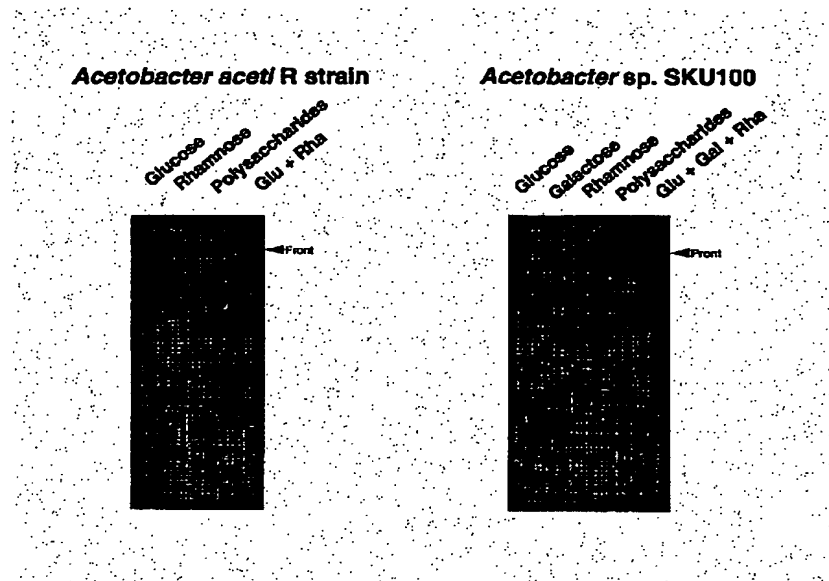


A. xylinum

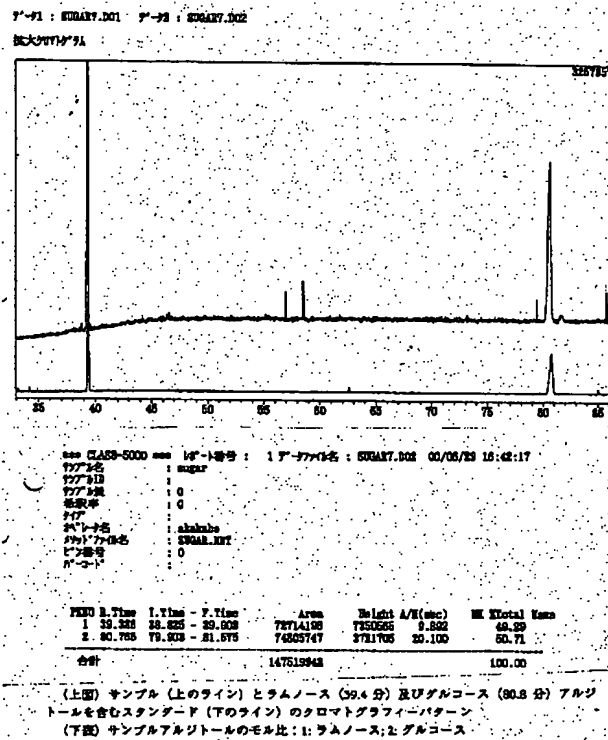


走査電子顕微鏡

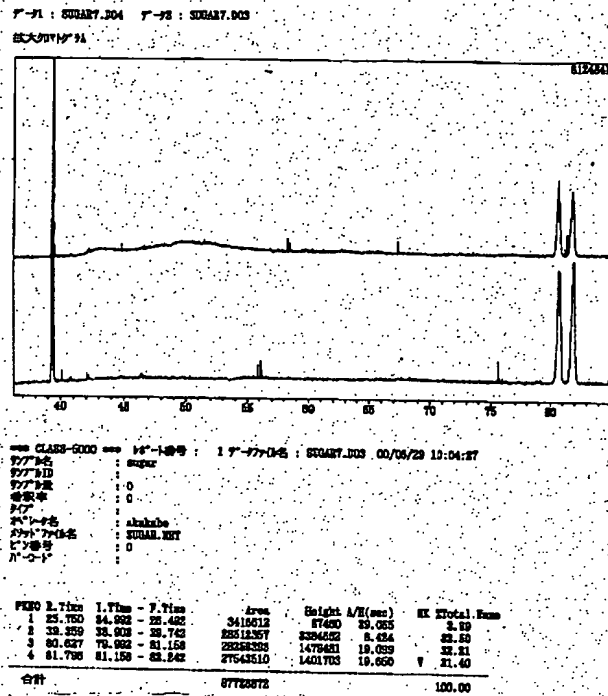
【図5】



【図6】



【図7】



(上図) サンプル (上のライン) とラムノース (39.4 分)、グルコース (80.4 分) 及びガラクトース (81.8 分) アルジトールを含むスタンダード (下のライン) のクロマトグラフィーパターン (下図) サンプルアルジトールのモル比: 1: ラムノース; 2: グルコース; 3: ガラクトース

【図8】

